

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 407 137**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/16** (2006.01)

**A61K 9/51** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2004** **E 04729885 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.02.2013** **EP 1638531**

54 Título: **Microesferas que contienen antígenos para alergioterapia**

30 Prioridad:

**27.06.2003 DE 10329087**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**11.06.2013**

73 Titular/es:

**BIOMEDICAL INTERNATIONAL R + D GMBH  
(100.0%)  
Wagramer Strasse 19  
1220 Wien , AT**

72 Inventor/es:

**JENSEN-JAROLIM, ERIKA;  
WALTER, FRANZISKA y  
GABOR, FRANZ**

74 Agente/Representante:

**DURÁN MOYA, Carlos**

ES 2 407 137 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Microesferas que contienen antígenos para alergioterapia

- 5 La presente invención se refiere a microesferas que contienen antígenos, en especial alérgenos y que sirven para terapia de las alergias.

10 Aproximadamente, el 20% de la población está afectada de alergias en las que interviene IgE, que pueden conducir desde síntomas ligeros, tales como fiebre del heno, hasta episodios graves de asma o de shock anafiláctico. En estos pacientes, las células madre y otras células efectoras de la alergia están cargadas de anticuerpos IgE. Al establecer contacto con el alérgeno, puede tener lugar el llamado disparo de las células, es decir, la liberación de mediadores, tales como histamina, que son responsables de los síntomas de la alergia.

15 El método estándar corrientemente utilizado en el tratamiento de la alergia es la llamada hiposensibilización con extractos naturales de alérgenos, los cuales después de largo tratamiento conducen a la reducción de los síntomas. El mecanismo efectivo no está todavía completamente aclarado, no obstante, se observa la inducción de anticuerpos IgG, que pueden actuar como anticuerpos de bloqueo. Además, después de una terapia de larga duración se discute la modulación de la respuesta TH.

20 Para hacer mejores inmunógenos de los alérgenos que frecuentemente son satisfactoriamente salubres, se utilizan habitualmente los llamados coadyuvantes, tales como, por ejemplo, trihidróxido de aluminio. Estos absorben la proteína del alérgeno y aumentan de esta manera su carácter inmunogénico.

25 Otra posibilidad de aplicación adicional consiste en las llamadas micro o nanopartículas descritas en la literatura especializada, que contienen sustancias inmunogénicas. Por ejemplo, Johansen y otros, describen la administración controlada de antígenos mediante microesferas de copolímeros de ácido poliláctico-ácido poliglicólico (las llamadas micropartículas PLGA).

30 La aplicación de alérgenos tiene lugar principalmente de forma subcutánea o intramuscular. Algunas referencias de la literatura, informan de investigaciones de terapia oral contra la alergia (European Journal of Allergy and Clinical Immunology, WHO Position Paper 44;53:20-21). La inmunoterapia sublingual es ya de aplicación clínica, no obstante, con éxito moderado (Rakoski J, Wessner D, Int. Arch. Allergy Immunol. 2001, Nov; 126(3): 185-7).

35 No obstante, la administración oral de sustancias inmunógenas incluidas en microesferas, es ya conocida también. Así, por ejemplo, se ha descrito por K.J. Maloy y otros la inducción de una respuesta inmune de las mucosas y sistémica, mediante la administración oral de micropartículas PLGA incluidas en ovalbumina (K.J. Maloy y otros, Immunology 1994, abr, 81(4): 661-7). Además, un trabajo de Pecquet y otros, ha mostrado que se puede administrar un alérgeno de ácido láctico en microesferas PLGA a ratones para profilaxis de alergia a la leche, por vía oral (Pecquet y otros, Vaccine 2000, 18: 1196-1202).

40 Desafortunadamente los métodos de tratamiento de alergias conocidos hasta el momento, no siempre tienen éxito, comprobándose muchas veces empeoramiento de los síntomas y existen datos que muestran que una hiposensibilización incluso excitar la síntesis de IgE. Esto puede basarse en la utilización del trihidróxido de aluminio (Al (OH)<sub>3</sub>) como coadyuvante, que se utiliza como coadyuvante para muchas sustancias de vacunación actuales. A base de investigaciones en animales, se conoce desde hace tiempo que el trihidróxido de aluminio puede fomentar incluso una respuesta TH<sub>2</sub>, es decir, la formación de IgE y, por lo tanto, genera una alergización. Además, se da la situación paradójica de que los pacientes alérgicos son inmunizados con un coadyuvante de alergización con extracto de alérgenos. Además, es necesaria una administración repetida de cantidades de alérgeno crecientes, al principio con periodos incluso semanales, lo cual resulta pesado para los pacientes. Las administraciones orales de los antígenos se han permitido en pacientes que llevan a cabo ventajosamente en su casa una vacunación por vía bucal.

50 Por esta razón, es un objetivo de la presente invención poner a disposición sustancias apropiadas, en especial alérgenos, en una forma para la terapia de las alergias que eviten los inconvenientes antes mencionados de las formas de administración conocidas de alérgenos y que posibilite una reacción fiable del paciente.

55 La invención se basa en el descubrimiento de que una forma de administración de este tipo, desarrolla en especial una eficacia satisfactoria cuando las microesferas liberan sus sustancias de manera dirigida y a lo largo de un prolongado periodo de tiempo en su tejido objetivo.

60 Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención microesferas para terapia de alergia que contienen antígenos y/o ADN de antígenos, en especial, alérgenos y/o ADN de alérgenos que se caracterizan porque las microesferas tienen una constante de enlace  $K_B$  mínima de  $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ , preferentemente, como mínimo, de  $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  y del modo más preferente, como mínimo,  $6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ , con respecto a los radicales de hidratos de carbono, preferentemente, alfa-L mucosa, de las células epiteliales intestinales y/o nasales.

Bajo el término antígenos se considerarán en la presente invención, no solamente sustancias que son reconocidas por el organismo como sustancias extrañas y que pueden generar una respuesta inmune o que pueden reaccionar con un anticuerpo o con receptores de células T, sino también sus derivados. Entre los alérgenos que se definen más adelante son preferentes los siguientes antígenos: antígenos virales, bacteriales, protozoarios, como también toxinas y antígenos de gusanos.

Es preferible que, no solamente se puedan incluir antígenos en las microesferas, sino también el ADN de antígenos. En este caso, existe la posibilidad de incorporar antígenos o ADN de antígenos solos o juntos en las microesferas. Es preferible que los antígenos sean alérgenos. Además, es preferible que los alérgenos y/o el ADN de alérgenos sean incorporados en las microesferas.

Bajo el término "microesferas" se entienden partículas que están constituidas preferentemente en forma de bola, o bien en forma esférica. Dado que en la producción de las microesferas, el medio de solución utilizado para el polímero, se evapora, se precipitan las microesferas y contienen antígenos pulverizados conjuntamente.

El concepto frecuentemente utilizado en la literatura de "nanopartículas" o bien "nanoesferas" se incluirá de manera correspondiente con el concepto "microesferas" o bien "micropartículas".

Con el concepto "alérgenos" se comprenden además de los extractos de alérgenos naturales anteriormente conocidos y moléculas de alérgenos, también mutantes de alérgenos, hipoalérgenos o partes de moléculas de alérgenos, tales como péptidos y también mimotopo de alérgenos. Los mimotopos de alérgenos, pueden ser, en este caso, asimismo, péptidos, sensiblemente péptidos con una longitud de frecuencia de aminoácidos de 5 a 25 aminoácidos. Los alérgenos se encuentran en la situación de provocar una alergia, es decir, una reacción de sobre reacción de tipo inmediato que es inducida por la síntesis de anticuerpos IgE. Los hipoalérgenos son derivados naturales o recombinantes de una molécula de alérgeno los cuales, a causa de una reducida diferencia con respecto a la secuencia de aminoácidos del alérgeno, adoptan una conformación en la que se pierden las propiedades de unión a IgE.

En especial, son preferentes los siguientes alérgenos para microesferas: Polen de abedul (Bet v 1), zanahoria (Dau c 1), apio (Api g 1), avellana (Cor a 1), polen de chopo (Aln g 1) y polen de gramíneas (entre otras u.a. Ph1 p 5, Phl p 1, Phl p 6, Phl p 7), así como ácaros de polvo doméstico (Der p 1, Der p 2) y peces (parvalbumina).

En especial, los siguientes mimotopos del alérgeno Phl p 5, son preferentes:

```

C S R L G R S S A W V C
C T H W Q L G E R P D C
C P S T P G E R V R H C
C R G G P D D L T A L C
C P F W V R G T T D W C
C Q V G P E C
C P S T P G S R Q N M C
C P S T P G D N P L V C
C K F V V N G R W I D C
C K F L V N G R W I D C
C R L T E N T E P L L C
C F T W G G L R D K S C
C E R A G A M E R A N C

```

```

C R S V S K E E P G M C
C K L G K F G A A R V C
C V Q D L M K S S G V C

```

En especial, es preferente el siguiente mimotopo del alérgeno Bet v 1:

CRSDKDGWRLWC

En todos los casos, tiene lugar la constitución de un puente de bisulfuro entre las cisteínas de los extremos. Los mimotopos fueron seleccionados mediante una biblioteca de 10-mer fagos péptidos (Mazzucchelli y otros.,

Mazzucchelli, L., Burritt, J.B., Jesaitis, A. J., Nusrat, A., Liang, T. W., Gewirtz, A. T., Schnell, F. J., y Parkos, C. A. Cell-specific peptide binding by human neutrophils. *Blood*, 93: 1738-1748, 1999) mediante IgE humanos específicos contra Phl p 5, o bien Bet v 1.

5 La estructura de las microesferas permite liberar los antígenos contenidos en las microesferas y/o el ADN de antígenos, en especial alérgenos y/o ADN de alérgenos, de manera lenta y regular. Una ventaja de esta liberación continuada de antígenos, en especial alérgenos está constituida por el hecho de que no se deben administrar dosis repetidas crecientes de antígenos, en especial, cantidades de alérgenos, tal como en la hiposensibilización convencional. Lo anteriormente indicado es válido, naturalmente también para la liberación de ADN de antígenos, o bien, ADN de alérgenos.

La adherencia de las microesferas en los tejidos objetivos de las mucosas es cuantificada por su adherencia a células caco-2.

15 Las células caco-2 (American Type Culture Catalogue Nr. HTB-37) son células epiteliales intestinales con elevada diferenciación (crecimiento polarizado, Mikrovilli, constitución de Tight Junctions), aisladas inicialmente de un carcinoma de colon humano. Tienen características de superficie que son representativas para el epitelio intestinal y sirven, por lo tanto, para el estudio de la adherencia de micropartículas. Además, se preparan micropartículas marcadas por fluorescente (FITC-Cadaverin) en las que fluoresceína-cadaverina es unida de forma covalente por el método de activación de carbono, por medio de los grupos carboxilo libres del polímero y esta unión es pulverizada en la instalación de secado por pulverización para conseguir microesferas. Estas son preferentemente funcionalizadas con una lectina deseada (ver más adelante) y a continuación, incubadas con las células caco-2, preferentemente a 4°C. La temperatura de 4°C es escogida, para la internalización en las células del epitelio mediante procesos de endocitosis y para evaluar la capacidad de adherencia pura. Después de abundante lavado con tampón fosfato en hielo, para sustraer uniones no específicas, las micropartículas unidas a las células son disueltas conjuntamente con las células caco-2 y se determina la fluorescencia contenida en las muestras en un espectrómetro de fluorescencia.

De manera preferente, las microesferas objeto de la invención presentan en su superficie sustancias que aumentan la adherencia en las células de las mucosas, y que no son tóxicas para el hombre.

Estas sustancias que se encuentran en la superficie de las microesferas, sirven no solamente para mejorar la adherencia, sino también la selección de los tejidos objetivo de las mucosas. En alérgenoterapia es deseable además que las sustancias de la superficie de las microesferas no sean tóxicas para el hombre y, por lo tanto, que no provoquen efectos secundarios perjudiciales.

Además, como sustancias preferentes en la superficie de las microesferas se utilizan preferentemente las lectinas. Son preferentes porque las lectinas no son tóxicas. Es especialmente preferente porque la lectina es comestible.

Las lectinas son proteínas o glicoproteínas que reconocen y se unen con polisacáridos muy específicos, también en forma de lípidos unidos o proteínas unidas.

Preferentemente, las microesferas según la invención, para alérgioterapia presentan en la superficie de la microesfera lectina aleuria aurantia (AAL).

Mediante la modificación superficial de las microesferas con lectinas aleuria aurantia se producirá la concentración selectiva y prolongación del tiempo de permanencia de las micropartículas en el intestino, por lo que se conseguirá un efecto terapéutico específico de las micropartículas. La lectina aleuria aurantia (AAL) procede de un hongo comestible y se une a la  $\alpha$ -L-Fucosa de las llamadas células M. Estas células M se derivan de células epiteliales intestinales con las que participan en las propiedades superficiales, tales como, por ejemplo, estructuras de carbohidratos (por ejemplo, alfa-L Fucosa), y que son componente del tramo de Peyer, órgano linfático del intestino, que juegan un papel crucial para la recepción local de antígenos y la estimulación del sistema inmunitario. Se puede hacer referencia además, a un tipo de células M del epitelio nasal, pudiéndose utilizar como diana mucosal (Clark y otros: *Adv Drug Deliv Rev* 2000 Sep 30;43(2-3):207-23; o Brooky y otros: *J Drug Target* 2001;9(4):267-79).

El aislamiento y caracterización de la lectina aleuria aurantia (AAL) se ha descrito en el libro "The Lektins: Properties Functions and Applications in Biology and Medicine" von I. E. Liener, N. Sharon und I. J. Goldstein (Academic Press 1986). La lectina que se une a fucosa se aísla del cuerpo frutal cupulífero de la naranja y se consiguió para el ejemplo de la firma Vektor Laboratories (Burlingame, USA). Tiene un peso molecular de 72.000, el punto isoeléctrico se encuentra entre 9,0 y 9,2, y la lectina está compuesta de 2 subunidades de una única cadena polipeptídica de 31 kDa. La AAL está compuesta de dos subunidades iguales, que presenta una constante de unión  $K_B$ , de  $6,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  con respecto a alfa-L Fucosa.

La afeidez (afinidad funcional) puede ser entre  $10^3$  y  $10^7$  veces más potente mediante enlaces multivalentes que la correspondiente afinidad de un lugar de unión individual. La capacidad de adherencia de las microesferas depende, por lo tanto del número de posibilidades de unión entre microesferas y células epiteliales, preferentemente del

número de enlaces lectina-célula. Es decir, las microesferas facilitan más de una posibilidad de unión, se aumenta también automáticamente la intensidad de la unión, puesto que en el caso de disolución se deben disolver todos los puntos de unión simultáneamente de las células epiteliales. La avidéz  $K_B$  es preferentemente, como mínimo,  $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ , más preferentemente, como mínimo  $1 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$  y de la forma más preferente, como mínimo,  $1 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$ . Además, es preferible que la avidéz de las micropartículas se alcance por la multiplicidad de AAL sobre las micropartículas.

Las microesferas, según la invención, son utilizables en alergioterapia. Se caracterizan en especial, por el hecho de que se depositan de modo dirigido en elevadas cantidades en las superficies mucosas de las zonas gastrointestinal y/o nasal y pueden desarrollar en ellas su efecto terapéutico. Por lo tanto, existe la posibilidad de la inmunización oral o nasal. La ventaja de esta inmunización se encuentra en la manipulación fácil que es también preferible por parte de los pacientes. La AAL no es tóxica, se puede utilizar de manera inofensiva en el hombre y es especialmente preferible.

Preferentemente, las microesferas presentan un diámetro de 0,1-100µm, de modo más preferente de 1-10µm y de manera más preferente 0,2-5µm. La distribución de dimensiones de las microesferas, se ha determinado mediante difracción por láser (analizador de tamaño de partículas de tipo difracción por láser Shimadzu SALD-1100). De él se puede observar que dimensiones máximas, tienen 50% o 90% de las microesferas. De manera preferente, se producen microesferas menores de 10µm, porque estas pueden ser absorbidas de manera más fácil por el epitelio intestinal. Son más preferentes microesferas menores de 8 µm y las más preferentes son microesferas menores de 5 µm.

La fabricación de las microesferas y/o nanoesferas, tiene lugar principalmente por técnica de emulsión doble, o bien por secado por pulverización. En uno de los ejemplos siguientes se describirá a título de ejemplo, la fabricación de las correspondientes partículas. Preferentemente, se fabricarán micropartículas cargadas de antígenos, de manera que el antígeno es dispersado en solución acuosa en un medio orgánico de solución, en el que se ha disuelto el polímero. Se han descrito diferentes modificaciones de este proceso como vaporización del medio de solución (S. McClean, E. Prosser, E. Meehan, D. O'Malley, N. Clarke, Z., Ramtoola and D. Brayden, Binding and uptake of biodegradable poly-DL-lactide micro- and nanoparticles in intestinal epithelia, Eur J Pharm Sci 6 (1998) 153-163., R.K. Gupta, A.C. Chang, P. Griffin, R. Rivera, Y.Y. Guo and G.R. Siber, Determination of protein loading in biodegradable polymer microspheres containing tetanus toxoid, Vaccine 15 (1997) 672-678.), Extraktion von Wasser-in Öl-in Wasser-Emulsionen-(J.L. Cleland, E.T. Duenas, A. Park, A. Daugherty, J. Kahn, J. Kowalski and A. Cuthbertson, Development of poly-(D,L-lactide-cogly-colide) microsphere formulations containing recombinant human vascular endothelial growth factor to promote local angiogenesis, J Control Release 72 (2001) 13-24., J.L. Cleland, A. Lim, A. Daugherty, L. Barron, N. Desjardin, E.T., Duenas, D.J. Eastman, J.C. Vennari, T., Wrin, P., Berman, K.K. Murthy and M.F. Powell, Development of a single-shot subunit vaccine for HIV-1. 5. programmable in vivo autoboot and long lasting neutralizing response, J Pharm Sci 87 (1998) 1489-1495.), secado por pulverización (N.E.S.N.WA., Controlled release microparticles comprising core coated microparticles, US Patent, Biotek Inc., Woburn, MA, November 18, 1986.) oder Phasentrennungs-Methoden (F.J.W. Processes for preparation of microspheres, US Patent, Sandoz, Inc., E. Hanover, NJ, US, 1979.)

La estructura básica de las microesferas está constituida por polímeros con grupos funcionales. Los grupos funcionales sirven en especial, para unir las sustancias que transmiten fuerza, en especial, y de manera preferente, la lectina y de manera más preferente, la AAL, químicamente con intermedio de una unión covalente a la superficie de las partículas, por ejemplo, con intermedio de una unión de amida.

El antígeno y/o el ADN de antígenos, preferentemente los alérgenos y/o ADN de alérgenos pueden ser incorporados físicamente o químicamente en las microesferas o nanoesferas. Preferentemente, y son incorporadas físicamente. Tal como se ha explicado anteriormente, la fabricación de las microesferas y/o nanoesferas, tiene lugar preferentemente, mediante técnica de doble emulsión secado por pulverización. En el procedimiento del secado por pulverización, una solución del polímero con un material disuelto, dispersado o emulsionado en la misma, es pulverizada en una corriente de aire caliente. El medio de solución se evapora y provoca la caída del polímero, por lo cual el material es embebido o recubierto. Las micropartículas generadas, son separadas en un aparato ciclónico y recuperadas en forma de polvo. La concentración de polímero y de material efectivo, la tasa de alimentación de la solución de pulverización. La temperatura de entrada, la cantidad de aire de pulverización y la potencia del aspirador se pueden variar como parámetros. Cuanto más finas son las gotas generadas, mayor es la superficie activa y, por lo tanto, mejor es la transferencia de calor y de material.

En la generación de las microesferas, se pulveriza preferentemente una emulsión de formiato de etilo/agua con 5% de polímero y 0,2% de proteína. La temperatura inicial del secador de pulverización, es preferentemente, de 45°C y la potencia de aspiración se ajusta preferentemente a 100%. El polímero está disuelto preferentemente en formiato de etilo y la proteína del extracto de polen de álamo, preferentemente en agua.

La funcionalización de las micro y/o nanoesferas tiene lugar preferentemente en dos etapas. En la primera etapa, los grupos carboxilo libres son activados mediante una reacción de carbodiimida sobre la superficie de microesferas,

preferentemente, microesferas de PLGA mediante 1-etil-3-(3-dimetil-aminopropil)carbodiimida (EDAC) y (N-[2-hidroxi-etil-piperazina-N'-[ácido 2-etansulfónico]] (NHS). A continuación, sigue el acoplamiento de la lectina con formación de una unión de amida estable.

5 De manera preferente, las microesferas para alergioterapia están constituidas por una estructura básica de un polímero o copolímero eliminables biológicamente. De esta manera, se garantiza que las partículas pueden ser eliminadas en el cuerpo. La eliminación se debe prolongar, no obstante, de manera que las partículas alcancen su lugar de destino y los antígenos y/o ADN de antígenos ceden, de manera continuada durante un largo periodo de tiempo, preferentemente alérgenos y/o ADN de alérgenos. La capacidad de eliminación biológica del polímero o  
10 copolímero, asegura que las micropartículas o nanopartículas no se depositan en una concentración elevada no deseada en el cuerpo.

De manera especialmente preferente, la estructura básica de las microesferas para alergioterapia, consiste en ácido poliláctico (PLA), que también es conocido con el nombre de polilactida, ácido poliglicólico (PGA), y también bajo el nombre de poliglicólido, o bien copolímero de ácido poliláctico-ácido poliglicólico (PGLA). Estos polímeros, pueden ser eliminados lentamente en el cuerpo en forma de sustancias no peligrosas. Las poliláctidas como sistemas de administración para péptidos y proteínas se describen en Johannsen y otros, European J. of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 50 (2000): 129-146.

20 Se podría incluir también como estructura básica de las microesferas el quitosan, y en especial, para alérgenos aniónicos.

Las micro y/o nanoesferas contienen preferentemente 0,1-20% en peso, especialmente de modo preferente 0,2-3% en peso de antígeno y/o ADN de antígenos. Es preferible que en las indicaciones de % en peso se haga referencia a indicaciones para alérgenos y/o ADN de alérgenos.

Es preferible que, las micro y/o nanoesferas contengan mimotopos de alérgenos, de modo más preferente mimotopos del alérgeno Phl p 5 y/o Bet v 1. Es especialmente preferente, que se utilicen mimotopos de los alérgenos Phl p 5 y/o Bet v 1 con las secuencias de aminoácidos que se han definido anteriormente.

30 Además, la presente invención se refiere a un procedimiento para la fabricación de las microesferas anteriormente mencionadas, caracterizado porque las microesferas presentan una constante de unión  $K_B$  de, como mínimo,  $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  con respecto al radical carbohidrato específico de células intestinales y/o nasales. Las microesferas son construidas tal como se ha descrito anteriormente.

35 Además, la presente invención se refiere a la utilización de microesferas para alergioterapia, que se caracteriza porque las microesferas presentan una constante de unión  $K_B$  de, como mínimo,  $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  con respecto al radical de carbohidrato específico de células epiteliales intestinales y/o nasales. Las microesferas presentan una construcción tal como se ha descrito anteriormente. La actividad  $K_B$ , en este caso es preferentemente, como mínimo, de  $10^{10} \text{ M}^{-1}$ , de modo más preferente  $1 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$  y lo más preferente de  $1 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$ .

A continuación, se explicará una forma de realización de las microesferas, según la invención, en base a las figuras, a título de ejemplo. En los dibujos:

45 La figura 1: Muestra titulación de IgG con respecto a Bet v 1 después de 2 inmunizaciones orales con micropartículas; se ha representado la detección de IgG con respecto a Bet v 1. Platos ELISA se recubrieron con Bet v 1 recombinante, incubado con "Mausseren" (diluido 1:100) y detectando IgG unido mediante IgG antirratón marcado con peroxidasa. La reacción fue visualizada mediante adición del sustrato y la reactividad fue medida con un lector ELISA. Los valores son directamente proporcionales a las cantidades del anticuerpo unido. Las abreviaturas significan: MS = microesferas, BP = extracto de polen de álamo, AAL = lectina aleuria aurantia, WGA = aglutinina de germen de trigo, PIS = suero preinmune, 1.MIS = primer suero inmune, 2.MIS = segundo suero inmune, OD = densidad óptica.

50 Figura 2: Comprobación de la antigenicidad de extracto de polen de álamo empacado en microesferas después de digestión gástrica; la representación gráfica muestra la antigenicidad de las diferentes micropartículas con dependencia temporal de la digestión gástrica. Las abreviaturas tienen los siguientes significados:

60 BP: extracto de polen de álamo, MS: microesferas, AAL: lectina aleuria aurantia, WGA: aglutinina de germen de trigo.

Figura 3: Comprobación cualitativa de la capacidad de adherencia de diferentes preparaciones de microesferas en células epiteliales intestinales humanas en la inmunofluorescencia.

65 Figura 4: Comprobación cuantitativa de la capacidad de adherencia de diferentes preparaciones de microesferas en células epiteliales intestinales humanas en fluorescencia-ELISA.

La lectina aleuria aurantia (AAL) presenta la ventaja con respecto a muchas lectinas de que no es tóxica. Otra lectina que sin embargo es tóxica, es la aglutinina de germen de trigo (WGA), de la que se sospecha de que a causa de su propiedad de unión a glicanos, se une en las células epiteliales intestinales y en particular por unión a la N-acetilglicosamina.

Tal como se muestra en los ejemplos que se describen a continuación, la AAL presenta, no obstante, la ventaja adicional inesperada con respecto a WGA de unir una cantidad significativa adicional de antígeno a la superficie de las mucosas. Esto podría ser debido a una mejor adherencia, sin embargo se considera en todos los casos como una ventaja, puesto que esta propiedad permite finalmente que los alérgenos incorporados en las micropartículas modificadas por AAL en la superficie pueden llegar bien direccionadas y en cantidades más elevadas al lugar de utilización terapéutica. Además, se posibilita de esta manera la administración repetida de cantidades crecientes de alérgenos con períodos cortos de separación porque las microesferas se encuentran en posición de liberar de manera lenta y continuada el alérgeno en el tejido diana.

### Ejemplos

Ejemplo 1: Microesferas PLGA acopladas por lectina, que contienen alérgeno, para la profilaxis y terapia oral de alergia.

Se consiguieron microesferas de PLGA (MS) mediante secado por pulverización. En este procedimiento se pulverizó una emulsión de agua y formiato de etilo con extracto de polen de álamo en una corriente de aire caliente. La mediana de las microesferas se determinó mediante difracción por láser ascendiendo a 5,5  $\mu\text{m}$ . La cantidad de proteínas de las micropartículas se determinó con 40  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de micropartículas. La funcionalización de las microesferas y con las lectinas correspondientes tuvo lugar con la constitución de una unión de amida. En la generación de las microesferas se pulveriza una emulsión de formiato de etilo/agua con 5% (p/v) de polímero y 0,2% (p/v) de proteína. El polímero se disuelve en formiato de etilo, la proteína del extracto de polen de álamo en agua. La emulsión es pulverizada en una corriente de aire caliente. El medio de solución se evapora y produce la precipitación del polímero de manera que las proteínas del extracto de polen de álamo quedan embebidas. Para la determinación de la proteína se disolvieron entonces las microesferas en 0,05N NaOH/1%SDS y se cuantificaron mediante una prueba de color (ensayo de ácido biquínico).

La funcionalización de las micro y/o nanoesferas llenas con proteínas del extracto de polen de álamo tiene lugar en dos fases. Para ello, las partículas son recogidas en tampón Hepes pH 7,2 y son activadas mediante adición de EDAC/NHS mediante una reacción de carbodihimida. Se suministra la AAL y la lectinas se acopla mediante constitución de una unión de amina estable a las micro y/o nanoesferas. Los restantes grupos carboxi activados son saturados con glicina.

Los resultados del modelo de inmunización se han mostrado en la figura 1. 4 grupos cada uno de 5 ratones Balb/c fueron inmunizados con micropartículas dos veces (día 0 y día 21) durante tres días sucesivos con micropartículas en PBS (volumen 150  $\mu\text{L}$ ) por vía intragástrica. Las micropartículas estaban o bien vacías o llenas de proteínas de polen de álamo. Una parte de las micropartículas que se habían llenado con proteínas de polen de álamo fue funcionalizada además con lectina aleuria aurantia o aglutinina de germen de trigo. Antes y después de dos semanas después de la inmunización se extrajo sangre de los ratones y se investigó la existencia de anticuerpos específicos Anti-Bet v 1. Esto tuvo lugar en un ELISA. En este caso, se recubrió extracto de polen de álamo en una concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de tampón carbonato pH 9,6. Después del bloqueo con PBS/0,1% BSA se incubaron ratones (con dilución 1:100 en tampón de bloqueo). Después de lavado con PBS, se detectó IgG unido con anticuerpos antiraton, conjugados con peroxidada. La reacción fue desarrollada mediante adición de sustrato y tuvo lugar en un lector ELISA la evaluación por lectura con OD 405-490 nm.

Tal como se puede apreciar en la figura 1, los grupos que fueron alimentados con micropartículas vacías o bien llenas con proteínas de polen de álamo no mostraron en ELISA ni en el primer suero de inmunización (1. columnas MIS gris) ni tampoco con el segundo suero de inmunización (2. columnas MIS gris-negro) un aumento relevante de anticuerpos IgG específicos de Bet v 1 con respecto al suero preinmune. Por el contrario, ambos grupos, en los que las micropartículas rellenas fueron funcionalizadas adicionalmente en el exterior con lectinas, mostraron un aumento sensible de los anticuerpos IgG dirigidos contra Bet v 1.

Ejemplo 2: Digestión gástrica.

Para comprobar la antigenidad de microesferas llenas con extracto de polen de álamo (BP-MS) después de digestión gástrica, se incubaron microesferas con pepsina a pH 1,5 durante intervalos de tiempo distintos. En microesferas llenas de proteína de polen de álamo, se pudo detectar antigénicamente incluso después de dos horas de digestión, por el contrario, en proteínas de polen de álamo no empaquetadas, eran destruidas dentro de un período de segundos. Las micropartículas acopladas con AAL reaccionaron en esta investigación, de manera igualmente ventajosa que otras preparaciones de microesferas (MS: microesferas solas, MS-WGA: microesferas acopladas con aglutinina de germen de trigo) y protección en la proteína antes de la digestión. Además, este

ejemplo muestra que la proteína de polen de álamo en el empaquetado en microesferas no pierde antigenidad con respecto a extractos no tratados.

La evaluación de la investigación tubular en un ELISA: la proteína de polen de álamo fue extraída de microesferas y se utilizó la solución para recubrimiento de placas ELISA. El alérgeno principal del polen de álamo unido Bet v 1 fue detectado con un anticuerpo Anti-Bet v 1 de conejo policlonal y, a continuación, detectado mediante un anticuerpo IgG Anti-conejo marcado con peroxidasa. La reacción fue visualizada por alimentación de sustrato y la señal fue medida en un lector ELISA. El antígeno unido es directamente proporcional a la reactividad y, por lo tanto, a la señal. Los resultados se han mostrado de forma gráfica, en la figura 2.

Ejemplo 3: Capacidad de adherencia cualitativa de diferentes preparaciones de microesferas.

La comprobación cualitativa de la capacidad de adherencia de diferentes preparaciones de microesferas sobre células epiteliales intestinales humanas, tubo lugar con el método de inmunofluorescencia. La línea celular Caco-2 fue saturada sobre plaquitas de vidrio e incubadas a 4°C con:

1. Extracto de polen de álamo empaquetado en microesferas (BP-MS), o bien
2. Extracto de polen de álamo empaquetado en microesferas, acoplado con aglutinina de (BP-WGA-MS), o bien
3. Extracto de polen de álamo empaquetado en microesferas, acoplado con lectina aleuria aurantia (BP-AAL-MS).

Para hacerlas visibles, las microesferas fueron cargadas con el colorante de fluorescencia isotiocianato de fluoresceína(FITC)-cadaverina. La visualización de las células epiteliales tuvo lugar con un anticuerpo anti-PLAP de conejo, seguido de IgG anticonejo conjugado con ALEXA 568. Los núcleos de las células fueron coloreados con tinte Hoechst.

Con respecto a microesferas no funcionalizadas, se evidenció en esta investigación, que la funcionalización con lectina mejora significativamente la unión de las partículas al epitelio. Los resultados se han mostrado en la figura 3.

Ejemplo 4: Comprobación cuantitativa de la capacidad de adherencia de diferentes preparados de microesferas.

La comprobación cuantitativa de la capacidad de adherencia de diferentes preparaciones de microesferas sobre células epiteliales intestinales humanas, tuvo lugar en ELISA de fluorescencia. La línea celular Caco-2 fue dispuesta en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos, hasta constituir recubrimientos cerrados monocapa. A continuación, tuvo lugar una incubación a 4°C con:

1. Extracto de polen de álamo empaquetado en microesferas (BP-MS), o bien
2. Extracto de polen de álamo empaquetado en microesferas, acoplado con aglutinina de (BP-WGA-MS), o bien
3. Extracto de polen de álamo empaquetado en microesferas, acoplado con lectina aleuria aurantia (BP-AAL-MS).

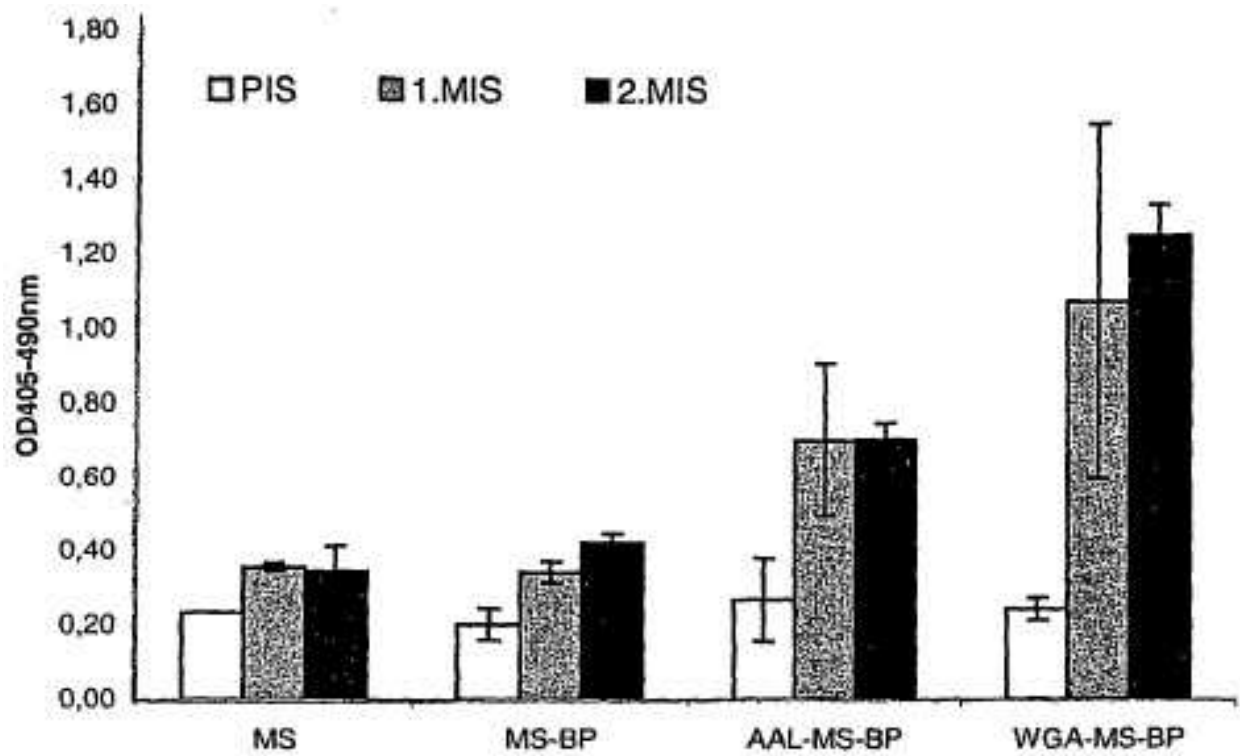
Para la visualización se utilizaron microesferas marcadas con FITC-cadaverina. La visualización de las células epiteliales tuvo lugar mediante detección por fluorescencia a 485/535 nm. La señal es directamente proporcional al número de partículas unidas.

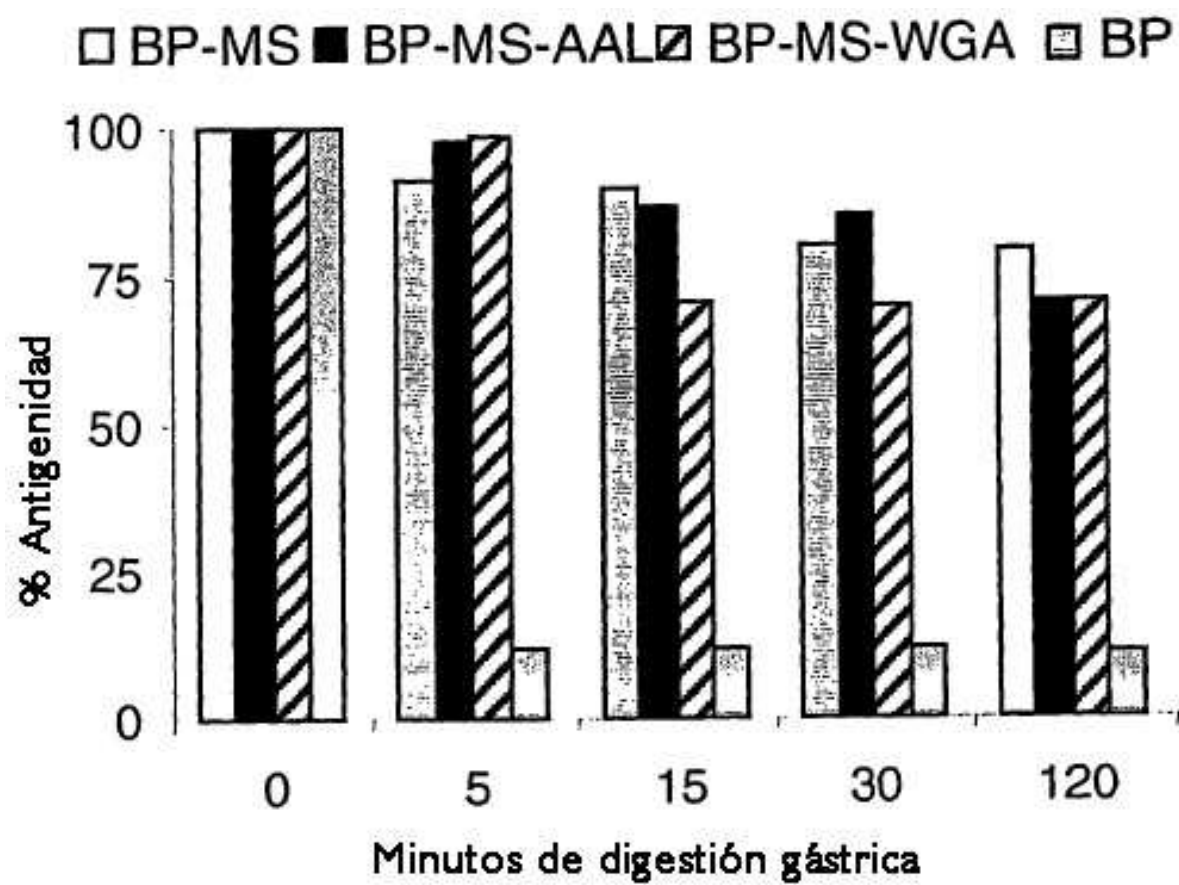
Con respecto a las microesferas no funcionalizadas, se evidenció en esta investigación, que la funcionalización con lectina mejoraba significativamente la unión de las partículas al epitelio. Ante todo, no obstante, el AAL presenta una capacidad de adherencia sensiblemente más elevada con respecto a WGA. Los resultados se han mostrado en la figura 4.



## REIVINDICACIONES

1. Microesferas para alergioterapia, que contienen antígenos y/o ADN de antígenos, **caracterizadas porque** las microesferas presentan una constante de enlace  $K_B$  mínima de  $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  con respecto al radical de carbohidrato específico de las células epiteliales intestinales y/o nasales.
2. Microesferas para alergioterapia, según la reivindicación 1, **caracterizadas porque** las microesferas tienen una aidez  $K_B$  mínima de  $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  con respecto al residuo de carbohidrato específico de células epiteliales intestinales y/o nasales.
3. Microesferas para alergioterapia, según las reivindicaciones 1 ó 2, **caracterizadas porque** las microesferas tienen lectinas en su superficie, que aumentan la adherencia a las células de las mucosas.
4. Microesferas para alergioterapia, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizadas porque** el residuo de carbohidrato específico es  $\alpha$ -L-Fucosa.
5. Microesferas para alergioterapia, según la reivindicación 4, **caracterizadas porque** la sustancia sobre la superficie de la microesfera es lectina no tóxica.
6. Microesferas para alergioterapia, según la reivindicación 4 ó 5, **caracterizadas porque** la lectina es comestible.
7. Microesferas para alergioterapia, según la reivindicación 4-6, **caracterizadas porque** la lectina es lectina-Aleuria-Aurentia.
8. Microesferas para alergioterapia, según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada porque** las microesferas tienen un diámetro de 0,1 a 100  $\mu\text{m}$ .
9. Microesferas para alergioterapia, según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizadas porque** la estructura básica de las microesferas está constituida por polímeros.
10. Microesferas para alergioterapia, según una la reivindicación 9, **caracterizadas porque** la estructura básica de las microesferas está constituida por polímeros con grupos funcionales.
11. Microesferas para alergioterapia, según una de las reivindicaciones 9 u 11, **caracterizadas porque** la estructura básica de las microesferas está constituida por polímeros o copolímeros eliminables biológicamente.
12. Microesferas para alergioterapia, según una de las reivindicaciones 8-11, **caracterizadas porque** la estructura básica de las microesferas está constituida por ácido poliláctico, ácido poliglicólico o copolímero de ácido poliláctico-ácido poliglicólico.
13. Microesferas para alergioterapia, según una de las reivindicaciones 9 a 12, **caracterizadas porque** la lectina aleuria aurantia está unida a los polímeros mediante una unión covalente.
14. Microesferas para alergioterapia, según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizadas porque** las microesferas contienen 0,1-20% en peso de antígenos o ADN de antígenos.
15. Microesferas para alergioterapia, según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizadas porque** los antígenos y/o ADN de antígenos son alérgenos y/o ADN de alérgenos.
16. Microesferas para alergioterapia, según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizadas porque** los antígenos son mimotopos del alérgeno Phl p 5 y/o del alérgeno Bet v 1.
17. Procedimiento para la fabricación de microesferas, según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** las microesferas son cargadas en primer lugar con antígenos y/o ADN de antígenos y, a continuación, las microesferas son funcionalizadas.
18. Utilización de microesferas, según una de las reivindicaciones anteriores 1 a 17, para la fabricación de un medicamento para alergioterapia.

**Figura 1**

**Figura 2**

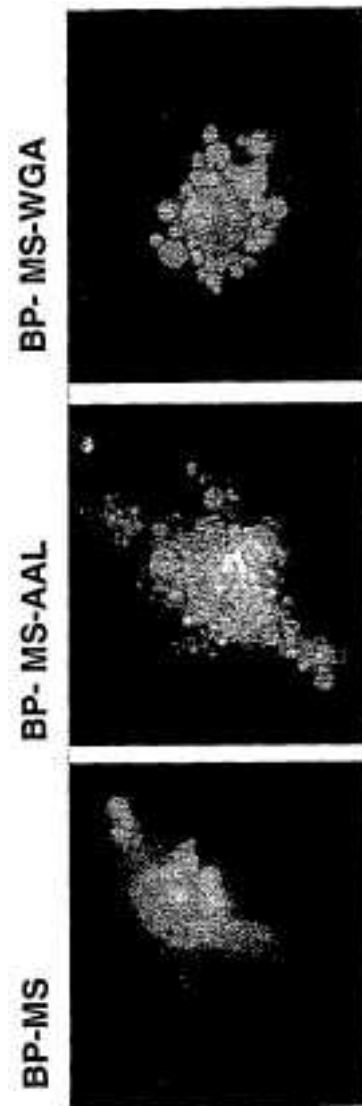


Figura 3

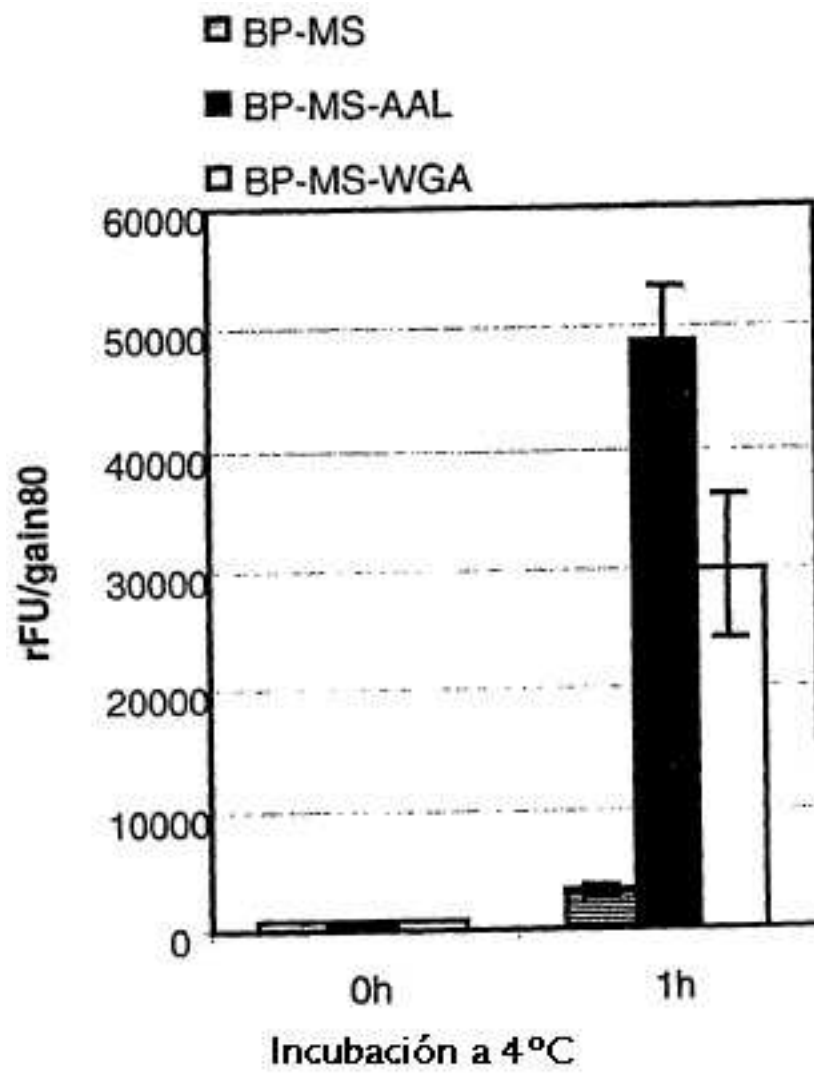


Figura 4